

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-289016

(43)公開日 平成6年(1994)10月18日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/50	P	7055-2 J		
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 Q 1/68	Z	7823-4B 9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁)				
(21)出願番号	特願平5-79630		(71)出願人	000002118 住友金属工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜 4 丁目 5 番33号
(22)出願日	平成 5 年(1993) 4 月 6 日		(72)発明者	小林 五月 大阪府大阪市中央区北浜 4 丁目 5 番33号 住友金属工業株式会社内
			(72)発明者	越坂 卓也 大阪府大阪市中央区北浜 4 丁目 5 番33号 住友金属工業株式会社内
			(74)代理人	弁理士 湯浅 慕三 (外 6 名)

(54)【発明の名称】 生物試料からのDNA抽出試薬、該試薬を用いるDNA抽出方法、並びにDNA抽出キット

(57)【要約】

【目的】 従来から使用されていたDNA抽出方法よりも短時間で容易に、しかも安全、安価に高純度のDNAを得ることのできるDNA抽出試薬、該試薬を用いたDNA抽出方法、ならびに該試薬を含むDNA抽出キットを提供する。

【構成】 以下の操作：

- a) 生物試料より細胞または核を粗抽出する、
- b) 以下の組成：
 - (1) タンパク質変性剤および(2)還元剤、界面活性剤およびキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性であるタンパク質溶解剤を加えることにより、細胞および核その他の構成成分、混在物を変性、可溶化する、そして
 - c) 有機溶媒によるDNA抽出を行わずに、そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行う、からなる生物試料からのDNAの抽出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の組成:

(1) タンパク質変性剤および(2)還元剤、界面活性剤およびキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性であるタンパク質溶解剤からなる生物試料からのDNA抽出試薬。

【請求項2】 タンパク質変性剤がカオトロブ剤であり、還元剤がチオール系還元剤であり、界面活性剤が当組成の水溶液中で沈殿を起こす恐れのないもの、もしくは沈殿が生じても何らかの手段により再溶解が可能なものであり、キレート剤が二価の金属イオンをキレートしうる能力を有するものである、請求項1に記載の試薬。

【請求項3】 カオトロブ剤がグアニジン塩酸またはグアニジンチオシアネートであり、チオール系還元剤が2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールであり、界面活性剤がN-ラウロイルサルコシナトリウムであり、キレート剤がエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩である、請求項2に記載の試薬。

【請求項4】 以下の操作:

a) 生物試料より細胞または核を粗抽出する、

b) 以下の組成:

(1) タンパク質変性剤および(2)還元剤、界面活性剤およびキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性であるタンパク質溶解剤を加えることにより、細胞および核その他の構成成分、混在物を変性、可溶化する、そしてc) 有機溶媒によるDNA抽出を行わずに、そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行う、からなる生物試料からのDNAの抽出方法。

【請求項5】 上記タンパク質溶解剤を加えて攪拌した後、55℃前後で30分間程度インキュベートを行う、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 以下の試薬:

a) 細胞溶解液、

b) 以下の組成:

(1) タンパク質変性剤および(2)還元剤、界面活性剤およびキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性であるタンパク質溶解剤、および

c) キレート剤と緩衝液との混在液からなる抽出したDNAを再溶解するための溶媒、を含む生物試料からDNAを抽出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、DNAを材料として使用する遺伝子工学、生化学、臨床検査などのバイオテクノロジーの分野に有用な生物試料からのDNA抽出試薬、該試薬を用いるDNA抽出方法、並びに該試薬を用いるDNA抽出キットに関する。

【0002】

【従来の技術】細胞、組織、細菌、ウイルスなどの生物試料からDNAを抽出するには、従来次の3段階からなる操作が最も普及している。

【0003】

1. 第1段階: 細胞の溶解とDNAの可溶化

DNAの可溶化はイオン性または非イオン性の界面活性剤を使用して細胞を溶解することに始まる。しかしながら、細胞の溶解はヌクレアーゼなどによる抽出DNAの分解を促進することになるので、細胞溶解液にはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩(EDTA)などのキレート剤を用いてヌクレアーゼの活性抑制を同時に行う必要がある。

【0004】次に、DNAはDNA-タンパク質複合体の形で存在するのでDNAをタンパク質から遊離させる必要が生じてくる。これには一般的に非特異的タンパク質分解酵素であるプロテイナーゼKが使用される。また同時に界面活性剤がDNAに結合しているタンパク質とミセルを作り、DNAからタンパク質を引きはがすことによって、このプロテイナーゼKの効果が高められると考えられている。

【0005】2. 第2段階: フェノール処理

フェノール処理は試料由来のタンパク質および精製過程で試料に添加した酵素類(プロテイナーゼK、リボヌクレアーゼなど)を変性、分離除去する目的で行われる。ここで、ある程度のヌクレアーゼおよびその他のタンパク質は変性され、フェノール層と水層の中間層に沈殿として現れる。この処理により、DNAは上層、すなわち水層に抽出され、タンパク質成分からの分離が成し遂げられる。

【0006】フェノールの他にもクロロホルム、フェノール-クロロホルム、クロロホルムとその他の有機溶媒の混合物も使用することができる。

【0007】核タンパク質を破壊する目的には、グアニジン塩酸、グアニジンチオシアネートなどに代表されるカオトロブ剤も知られている。これらの試薬は高モル濃度で使用され、タンパク質の破壊がヌクレアーゼの活性抑制を兼ねていることから広く使用されている。しかし、カオトロブ剤は一般的にはリボヌクレアーゼの不活性化剤としてRNAの抽出に主に使用されているのが現状のようである。

【0008】3. 第3段階: アルコール沈殿

アルコール沈殿は溶液中のDNAの濃縮およびフェノール、塩、ヌクレオチドなどの混在物の除去の目的で行われ、0.1-0.5Mの1価の陽イオンの混在下で行われる。アルコールとしては2倍容積のエタノール、もしくは0.6倍容積のイソプロパノール(2-ブパノール)が使用される。この操作によりDNAは白色沈殿として回収される。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このような従来の方法は、酵素処理が不可欠であり、またDNAをその他のタンパク質から分離するのが困難のためにカラム処理を行うなど、時間がかかるだけでなく操作も繁雑であった。また、フェノール、クロロホルムなどの有機溶媒の使用は危険で人体に有害であるという欠点を有している。さらにこのような有機溶媒を使用すると、抽出物を他の容器に移し変えねばならず、使用チューブの数が多くなるという問題も含んでいる。

【0010】そこで、本発明は、①60-120分程度の短時間の簡単な操作で高収率および高純度のDNAを抽出できる、②1本のチューブで実施できるので、臨床分野で利用する際の汚染(コンタミネーション)を防ぐことができる、③使用チューブ数が少なく、使用試薬も比較的安価なので経済的である、④フェノール、クロロホルムまたはその混合物など危険で人体に有害な有機溶媒を使用しない、⑤タンパク質分解酵素などを用いた酵素処理を必要としない、新規な生物試料からのDNA抽出試薬、該試薬を用いるDNA抽出方法、並びに該試薬を含むDNA抽出キットを提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、細胞、組織、細菌、ウイルスなどからDNAを抽出する際に、本発明の試薬の各成分の組成および濃度を工夫することにより、細胞、核、ウイルス粒子などから簡易にしかも再現性よくDNAが可能となること、さらに使用するチューブの数を減らしうることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0012】本発明は、以下の組成：

(1) タンパク質変性剤および(2)還元剤、界面活性剤およびキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性であるタンパク質溶解剤からなる生物試料からのDNA抽出試薬を提供する。

【0013】本発明はまた、以下の操作：

a) 生物試料より細胞または核を粗抽出する、
b) 以下の組成：
(1) タンパク質変性剤および(2)還元剤、界面活性剤およびキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性であるタンパク質溶解剤を加えることにより、細胞および核その他の構成成分、混在物を変性、可溶化する、そして
c) 有機溶媒によるDNA抽出を行わずに、そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行う、からなる生物試料からのDNA抽出方法を提供する。

【0014】本発明はさらに、以下の試薬：

a) 細胞溶解液、
グアニジン塩酸
2-メルカプトエタノール

* b) 以下の組成：

(1) タンパク質変性剤および(2)還元剤、界面活性剤およびキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む水溶液であって、pHが弱酸性から弱アルカリ性であるタンパク質溶解剤、および
c) キレート剤と緩衝液との混在液からなる抽出したDNAを再溶解するための溶媒、からなる生物試料からDNAを抽出するためのキットを提供する。

【0015】本発明の試薬を用いるDNA抽出は以下の手順で行う。

【0016】(a) 生物試料から細胞または核の粗抽出を公知の方法により行う。生物試料が血液である場合には、後述するRCLB (Red Cell Lysis Buffer) を用いる方法、デキストランを用いる方法、バッフィーコートを取る方法などを使用することができる。生物試料が培養細胞である場合にもRCLBを用いることができる。また、対象試料が微量、または混入タンパク質成分などが微量であると考えられる場合、または血清中のウイルス粒子からDNAを抽出する場合には、この操作を行わず、次の(b)の操作より行うことができる。

【0017】(b) 次に単離した細胞もしくは核の変性可溶化を本発明のDNA抽出試薬を用いて行う。

【0018】本発明のDNA抽出試薬はタンパク質変性剤を必須成分として含む水溶液である。タンパク質変性剤としてはカオトロープ剤が好ましく、グアニジン塩酸、グアニジンチオン酸などが特に好ましい。

【0019】本発明のDNA抽出試薬はさらに、還元剤、界面活性剤およびキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種を含む。還元剤としては、ジスルフィド結合を切断できるチオール系還元剤が好ましく、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどが特に好ましい。界面活性剤としては、本発明の試薬組成の水溶液中で沈殿を起こす恐れのないもの、もしくは沈殿が生じても何らかの方法により再溶解が可能なものが好ましく、N-ラウロイルサルコシナトリウム、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(Triton X-100)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween 20)、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル(NP-40)などが特に好ましい。キレート剤としては、二価の金属イオンをキレートする能力を有するものが好ましく、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩(EDTA)などが特に好ましい。これらのうちのどれを使用するかは生物試料の種類や得られるDNAの性質などに依存する。

【0020】本発明のDNA抽出試薬の一例と好ましい濃度範囲(混合液中での最終濃度)を以下に示す：

3-8M
0.05-0.4M

N-ラウロイルサルコシンナトリウム
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩

上記試薬は pH が弱酸性から弱アルカリ性で使用する。
【0021】本発明の抽出試薬を用いて細胞もしくは核の変性可溶化を行うには、上記組成の試薬を(a)で得られる粗抽出物に加えて、DNAの物理的切断を避けるために、穏やかな攪拌を行うことのみでこれを行う。あるいは、本発明の抽出試薬にとって必須成分であるタンパク質変性剤を加え、次いでその他の必要な構成成分を順次加えてもよい。

【0022】上記攪拌の後、55℃前後でインキュベーターを30分程度行うと、より一層上記試薬溶液の効能が上がり、DNA遊離能が高められる。

【0023】(c) 次いでイソプロパノール、エタノールなどの低級アルコールを添加してDNAを沈殿させる。この操作をアルコール沈殿という。イソプロパノールを用いる場合には等容量以上、エタノールを用いる場合には、エタノール最終濃度が65%以上になるように添加する。操作が容易である点からイソプロパノールがより好ましい。

【0024】沈殿したDNAを回収するには、遠心を行って上清を捨てるか、あるいは液量が多いときにはスポイト、または先を切り取ったピペットでDNAを吸い取り分取する。

【0025】次いで、アルコール沈殿して得られたDNAを70%エタノールで洗浄し、5分程度真空乾燥を行いアルコール分をとばした後、適当な溶液に再溶解して保存することにより使用可能な状態となる。再溶解に適した溶液は、例えばキレート剤と緩衝液との混合液であり、以下の組成のTE溶液が特に好ましい(濃度は混合液中での最終濃度)：

10 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.0)

1 mM EDTA 溶液 (pH 8.0)

本発明による上記の方法は、従来の技術と組み合わせで使用することも可能である。例えば、請求項2に記載の試薬に溶解した後、フェノールやクロロホルムで抽出し、アルコール沈殿を行うことにより血液からゲノムDNAを抽出する。またバーンボイム(Birnboim) H. C. とドリー(Doly) J. のアルカリ-SDS法(Birnboim H. C. and Doly J. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1513) により、大腸菌のDNA、高タンパク質を除いた「プラスミド粗抽出液」に請求項2に記載の試薬を添加し、アルコール沈殿を行うといった、大腸菌などからのプラスミドDNAの抽出などにも本発明の方法は応用できる。

【0026】本発明のキットには、上記タンパク質溶解剤の他に細胞溶解液ならびにキレート剤と緩衝液との混合液が含まれる。

【0027】細胞溶解液は血液、組織や培養液中の主に核成分をその他の混在する細胞構成物質から分離する。

0.1-2% (W/V)
1-100 mM

いかなる公知の細胞溶解液でも用いることができるが、生物試料が血液である場合には、例えばRCLB溶液[最終濃度が0.32 M ジュークロース、1% (V/V) ポリオキシエチレン(10) オクタフルエニールエーテル、5 mM 塩化マグネシウム、12 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)を組成とする水溶液]をキットに含めることができる。

【0028】キレート剤と緩衝液との混合液には、例えば上記の組成のTE溶液を用いることができる。

【0029】本発明の作用について、試薬を構成する各成分の作用および効能から考察する。タンパク質変性剤の1つであるグアニジン塩酸などのカオトロブ剤はタンパク質変性可溶化作用とともにヌクレアーゼ活性阻害作用がある。従って、単離された細胞もしくは核などを膜構造破壊もしくは可溶化して、結果として核中のDNAが試薬溶液中に遊離される。

【0030】2-メルカプトエタノールに代表される還元剤はタンパク質中のイオウ原子どうしとの結合であるジスルフィド結合を還元切断し、タンパク質の高次構造を破壊し溶解性を高めるともに、この作用によりタンパク質変性剤の効果を高める役割があると考えられる。

【0031】N-ラウロイルサルコシンナトリウムなどの界面活性剤は、DNAに付着しているタンパク質や脂質とミセルを形成し、これを可溶化させることによりDNAを遊離させる機能を有している。

【0032】EDTAなどの二価のキレート剤はヌクレアーゼの活性発現に必要なMg²⁺などの二価金属イオンを強力にキレートし、抽出DNAのヌクレアーゼによる分解を防止する機能を有している。

【0033】本発明の方法により抽出されたDNAの検定は以下の項目により行うことができる。

【0034】(1) 抽出量
抽出DNAの量は、上記TE溶液に溶解後、分光光度計(光路長:1 cm)により波長260 nmにおける吸光度を測定し、1 OD=50 µg/mlなる換算式より求めるものとした。通常、健康人血液1 mlから20-50 µg程度のDNAが抽出される。

【0035】(2) 純度の決定
[タンパク質の混入] 抽出DNAはTE溶液に溶解後、分光光度計により核酸のピーク吸収波長である260 nm、タンパク質のピーク吸収波長である280 nmにおける吸光度を測定し、その比A₂₆₀/A₂₈₀を計算することにより測定した。通常、純度の高いDNA溶液のA₂₆₀/A₂₈₀の値は1.8-2.0である。

【0036】[多糖類の混入] 抽出DNAはTE溶液に溶解後、分光光度計により核酸のピーク吸収波長である260 nm、多糖類のピーク吸収波長である234 nmにおける吸光度を測定し、その比A₂₆₀/A₂₃₄を計算

することにより測定した。通常、 A_{260}/A_{280} の値が小さいほど脂質の混入が少ないと考えられる。

【0037】[RNAの混入] 抽出DNAを0.5 μ g 使用し、0.6%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりDNA以外の染色バンド(RNAはゲノムDNAより分子サイズが小さいため、低分子側にバンドとして検出される)の存在の有無を観察することにより行う。抽出DNAをリボヌクレアーゼ処理(DNA:リボヌクレアーゼ(重量比)=2:1で混合、37℃、1時間インキュベート)したものと同じものを同様にインキュベート後、電気泳動し、染色像に変化が生ずるかどうかを観察することにより行う。

【0038】[ヌクレアーゼの混入] 抽出DNAを数種の塩濃度のヌクレアーゼ用緩衝液とともに37℃、4時間インキュベートし[RNAの混入]の項に記載した方法と同様の電気泳動を行い、インキュベートしなかったものを対照として泳動像に変化が生ずるかどうかを観察することにより行う。

【0039】(3) 抽出DNAの分子重量測定 上記[RNAの混入]の項に記載の電気泳動条件と同様の条件で抽出DNA 0.5 μ gを泳動し、同一ゲルで電気泳動した分子量マーカーのバンドと比較して測定する。本発明の方法により抽出したDNAは20Kb以上である。

【0040】本発明の方法によって抽出されたDNAは純度が高く、これを遺伝子工学の各種分野に応用することができる。例えば、本発明の方法によって抽出したDNAを遺伝子増幅技術の1つであるPCR(Polymerase Chain Reaction)などに用いることができる。また、抽出DNAは各種の制限酵素により切断可能であるので、市販の制限酵素を購入したときに、各種の緩衝液を用いて制限酵素による切断をすることができる。またさらには、抽出DNAを直接または電気泳動後、固相化し、抽出DNAの配列に相補的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、検出することが可能である。このように本発明の応用範囲は極めて広範囲である。

【0041】以下に記載する実施例によって本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

【0042】

【実施例】

実施例1. 生物試料の前処理

各種生物試料から細胞、核などを単離するには、以下の方法を用いることができる。なお、対象試料が微量、または混入タンパク質成分などが微量である場合や血清からのウイルスDNAの抽出の場合にはこの操作を行わず、次の段階に進むことができる。

【0043】対象が血液でない場合はRNAの混入が考えられるためリボヌクレアーゼ処理の必要も生じること

がある。

【0044】(1) RCLBを用いる方法

a. 対象が血液である場合
前述の組成のRCLBを用いるが、この操作はDNAのヌクレアーゼによる分解を防止するため、氷水中で行うことが望ましく、他の方法についてもRCLBを用いる場合は同様である。

【0045】RCLBを検体血液に対し、検体血液の2倍容量添加し穏やかに攪拌する。次に、2000g、5分間、4℃で遠心分離し上清を捨て沈渣を回収する。

【0046】b. 対象が培養細胞である場合
培養液中の培養細胞を2000g、5分間、4℃で遠心分離し、上清を除去し、沈渣として回収する。細胞数としては $10^4 - 10^7$ が適当である。

【0047】細胞を0.2mlの生理食塩水に再分散させ、0.4mlのRCLBを添加し、穏やかに攪拌し、2000g、5分間、4℃で遠心分離する。上清を除去し、沈渣を回収する。この操作をもう一度繰り返し、同様に沈渣を回収する。

【0048】c. 対象が組織である場合
組織切片を液体窒素などで凍結、破砕し、使用組織量に応じてRCLBを添加し、穏やかに攪拌した後、2000g、5分間、4℃で遠心分離する。上清を除去し、沈渣を回収する。この操作をもう一度繰り返し、同様に沈渣を回収する。

【0049】

(2) デキストランを用いる方法(対象:血液)
血液使用容量1に対して生理食塩水(0.9%(W/V)塩化ナトリウム水溶液、含滅菌)を1、さらに6%(W/V)デキストランを含む生理食塩水を0.4添加し、穏やかに混和し、30分間室温に放置する。この液は2層に分離するので、上清を回収し、500gで10分間遠心分離し、上清を除去し、沈渣を回収する。

【0050】この沈渣を使用血液量と等容量の生理食塩水で洗い、同様に遠心分離して沈渣を回収する。なお、この段階では生理食塩水の代わりにRCLBを用いてもさしつかえない。この操作は2回行う。

【0051】

(3) バッフィーコートを取る方法(対象:血液)
40 抗凝固剤入りの血液を500xg、5分間遠心分離し、バッフィーコートを分取する。これにRCLBを使用血液量と等容量添加し、穏やかに攪拌し、同様に遠心分離し、沈渣を回収する。この操作をもう一度行い、同様に沈渣を回収する。

【0052】

(4) 大腸菌からのプラスミドDNAの抽出
大腸菌の含まれている培養液を1.5mlチューブに取り、8000g、2分間、4℃で遠心分離し、上清を除去し、大腸菌を沈渣として回収する。これを100 μ lの25mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)、50mM

M グルコース、10mM EDTAを添加し再懸濁する。これに200 μ lの0.2N 水酸化ナトリウム、1% SDSを添加し、穏やかに混合後、5分間水中に放置する。8000g、10分間、4℃で遠心分離し、上清を回収する。次いで、5 μ lのリボヌクレアーゼ溶液(1mg/ml)を加え混合し、37℃で30分間インキュベートする。

【0053】実施例2. DNAの遊離(タンパク質成分などの変性、可溶性)

タンパク質溶解剤として以下の組成の水溶液からなる試薬を調製した:

4M グアニジン塩酸

0.2M 2-メルカプトエタノール

* 0.5% N-ラウロイルサルコシナトリウム

50mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩
実施例1で単離した細胞、核などに上記タンパク質溶解剤を添加し、穏やかに攪拌し沈渣を溶かしこむ。プラスミドおよび血清中のウイルスの場合には抽出液に上記タンパク質溶解剤を添加して混合する。

【0054】加えるタンパク質溶解剤の量は、対象が血液である場合は、単離方法の如何にかかわらず、出発血液量に依存させる。組織が対象の場合は組織の種類により使用量が異なる。プラスミドDNAの場合は上記の方法では0.5-1mlを使用する。以下の表1に使用するタンパク質溶解剤の使用量を示す。

【0055】表1

使用検体	血液		培養細胞	ウイルス
使用検体量	0.1~0.2ml	1.0~5.0ml	10 ⁶ ~10 ⁷	血清容量
タンパク質溶解液	0.5ml	血液量 \times 1/2 容量	0.5ml	使用血清量 に対し等容量以上

次いで55℃で30分間インキュベートする。インキュベート後室温になるまで放置し、添加したタンパク質溶解剤と等容量のイソプロパノールを添加し、穏やかに攪拌し、DNAを析出沈殿させる。上清を除去し、析出したDNAを1mlの70%エタノールで2回洗浄し、上清を除去した後5分間真空乾燥し、抽出DNAを得る。得られたDNAを適当量のTE溶液に再溶解する。

【0056】

実施例3. ヒト血液より抽出したDNAの量および性状
健康人の血液(検体No. 1-18)から実施例2の方法によって抽出したDNAの抽出量を、抽出DNAの検定(1)抽出量の項で記載した方法により算出した。また、同じく抽出DNAの検定(2)純度の決定の項で記

※載した方法により、 A_{260}/A_{280} によってタンパク質の混入を、また A_{264}/A_{260} によって多糖類の混入を測定して、抽出DNAの純度を検定した。

【0057】前処理の違いおよび抽出法の違いによる差も明らかにするため、以下に記載した各種の方法による抽出結果を表2に示す。なお、表中の略号は次の意味を有する:

R: RCLBを用いる方法

D: デキストランを用いる方法

B: バッフィーコートを用いる方法(当法ではバッフィーコート部分を厳密に分取している)

P: バッフィーコートを回収した後にフェノールクロロホルムを用いた従来の方法

表2

検体 No.	使用血液量	前処理抽出法	A_{260}/A_{280}	A_{264}/A_{260}	抽出量(μ g)	抽出量(μ g/血液ml)
1	5ml	R	1.865	0.453	124.4	24.9
2	5ml	R	1.822	0.472	246.6	49.3
3	3ml	R	1.861	0.429	105.8	35.3
4	3ml	R	1.838	0.436	84.8	28.3

11				12		
5	1nl	R	1.868	0.439	37.4	37.4
6	1nl	R	1.957	0.414	33.3	33.3
7	0.5nl	R	1.695	0.429	14.1	28.2
8	0.5nl	R	1.702	0.480	12.7	25.5
9	0.3nl	R	1.841	0.376	9.72	32.4
10	0.3nl	R	1.835	0.369	10.3	34.3
11	0.1nl	R	1.908	0.336	3.00	30.0
12	0.1nl	R	1.783	0.250	2.59	25.9
13	1nl	D	1.913	0.491	23.1	23.1
14	1nl	D	1.872	0.617	36.3	36.3
15	1nl	B	1.801	—	6.8	6.8
16	1nl	B	1.922	—	2.6	2.6
17	2nl	P	1.887	0.440	80.8	40.4
18	6nl	P	1.847	0.445	54.7	9.1

表から明らかなように、本発明によって得られたDNAは抽出量、純度ともに従来法と同等か、あるいはそれよりも良好な結果を示した。

【0058】実施例4. 抽出DNAの分子量、各種混入物の検定および制限酵素処理

健康人の血液(2検体)から実施例2の方法で抽出したDNAを用いて、各種緩衝液(H緩衝液、M緩衝液、L緩衝液)とインキュベートし、次いでアガロースゲル電気泳動に付した。得られた結果を図1に示す。図中、左レーンは試験群を、右レーンはコントロール群(緩衝液を加えるが、インキュベートしないもの)を表す。もしも抽出DNA中にヌクレアーゼが混入していれば、DNAは自己分解し、断片が電気泳動上で出現するはずである。図から明らかなように、試験群とコントロール群とに差異がみられず(レーンH-1、2、レーンM-1、2、レーンL-1、2)、本発明の方法で得られたDNAにヌクレアーゼが混入していないことを示す。

【0059】さらに、同じ実験を制限酵素EcoRIを加えて行ったところ、図1に示すように、試験群ではDNAが切断されてスメアとなった(レーンE-1、2)。普通、サザンブロッティングを行うときには、制限酵素で切断するが、もしもDNAの精製が不十分でタンパク質がこれに付着していると、制限酵素が作用しなくなる。したがって、上記実験は本発明の方法で抽出したDNAの精製が完全に行われたことを示す。

【0060】次に、抽出DNA中へのRNAの混入を調べるために、前記した純度の決定「RNAの混入」の項に記載した方法によって、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、図1に示すように、試験群とコントロール群とに差異が見られなかった(レーンR-1、2)。これは本発明の方法による抽出DNAにRNAが混入していないことを示す。

【0061】

実施例5. 抽出DNAの増幅(PCR法への応用)

健康人の血液から実施例2の方法で抽出したDNAを用いて、ヒト白血球抗原(HLA)クラスII抗原DRB1

をコードしているDNAに特異的なプライマーを用いて増幅、タイピングした(住友金属社製:スマイテストHLA-DRグループ判定キット使用)。アクリルアミド電気泳動による結果を図2に示す。 β -グロブリンの増幅バンドより下に観察されるバンドが、本タイピングにより増幅されたバンドである。

【0062】PCRによるDNAの増幅には通常厳密な条件を必要とするが、図2から明らかなように、本発明の方法によって抽出されたDNAはPCRの増幅にも使用できる高純度のものである。これによって、移植の際のHLAの型の判定や診断への応用が可能である。

【0063】実施例6. 抽出DNAを用いたジェノミックスザンハイブリダイゼーションへの応用
本発明の方法により得たヒトゲノムからのDNAを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。抽出DNAを制限酵素で処理した後、アガロースゲル電気泳動し、メンブランにブロッティング後ハイブリダイゼーションを行った結果を図3に示す。このように本発明によると、ジェノミックスザンハイブリダイゼーションに应用できる長いDNAを安定して得ることができる。

【0064】

【発明の効果】本発明によって、フェノールクロロホルムを用いた方法、アルカリ変性を用いた方法、煮沸による方法、タンパク質分解酵素を用いた方法などの従来から使用されていたDNA抽出方法よりも短時間で容易に、しかも安全、安価に高純度のDNAを得ることができ、また、本発明の方法によって抽出、精製されたDNAは、各種遺伝子工学の材料として十分に使用可能なものであり、その応用分野は極めて広い。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法により抽出したDNAの分子量、各種混入物の検定および制限酵素処理の結果を示すアガロースゲル電気泳動の図である。

【図2】本発明の方法により抽出したDNAを用いてPCR法により増幅した結果を示すアクリルアミド電気泳動の図である。

【図3】本発明の方法により抽出したDNAを用いてジ
エノミックサザンハイブリダイゼーションを行った結果*

【図1】



図1 抽出DNAの分子量、各種混入物の検定、及び制限酵素処理
r-y (X) (Xの後の-1, -2は、2検体ずつ試験したことを示す)
(各レーンの抽出DNAアプライ量は5 μ g)

Ma : 分子量マーカー (λ/HindIII digest + ϕX174/HaeIII digest)																					
H : 試験群	H緩衝液とインキュベート (37℃、4時間)																				
コントロール群	H緩衝液とインキュベート (37℃、0時間)																				
M : 試験群	M緩衝液とインキュベート (37℃、4時間)																				
コントロール群	M緩衝液とインキュベート (37℃、0時間)																				
L : 試験群	L緩衝液とインキュベート (37℃、4時間)																				
コントロール群	L緩衝液とインキュベート (37℃、0時間)																				
E : 試験群	EcoRI (40U) とインキュベート (37℃、1時間)																				
コントロール群	DNA (5μg) をそのままアプライ																				
R : 試験群	RNase (2.5μg) とインキュベート (37℃、1時間)																				
コントロール群	何もいれずに 37℃、1時間インキュベート																				
<table><tr><th></th><th>Tris-HCl (pH 7.5)</th><th>MgCl₂</th><th>Dithiothreitol</th><th>NaCl</th></tr><tr><td>H緩衝液</td><td>50 mM</td><td>10 mM</td><td>1 mM</td><td>100 mM</td></tr><tr><td>M緩衝液</td><td>10 mM</td><td>10 mM</td><td>1 mM</td><td>50 mM</td></tr><tr><td>L緩衝液</td><td>10 mM</td><td>10 mM</td><td>1 mM</td><td>—</td></tr></table>			Tris-HCl (pH 7.5)	MgCl ₂	Dithiothreitol	NaCl	H緩衝液	50 mM	10 mM	1 mM	100 mM	M緩衝液	10 mM	10 mM	1 mM	50 mM	L緩衝液	10 mM	10 mM	1 mM	—
	Tris-HCl (pH 7.5)	MgCl ₂	Dithiothreitol	NaCl																	
H緩衝液	50 mM	10 mM	1 mM	100 mM																	
M緩衝液	10 mM	10 mM	1 mM	50 mM																	
L緩衝液	10 mM	10 mM	1 mM	—																	

【図2】



図2 抽出DNAの増幅（PCR法を用いた場合）

HLAクラスII抗原DRB1をコードしているDNAに特異的なプライマーを用いて増幅、タイピングした結果。β-グロブリンの増幅バンドより下に観察されるバンドが、本タイピングにより増幅されたバンドである。（住友金属製スマイテーストHLA-DRグループ型判定キット使用）

M：分子標マーカー（pBR322/HaeIII digest）

→：この位置のバンドは内部標準として増幅させたβ-グロブリンのバンド

【図3】

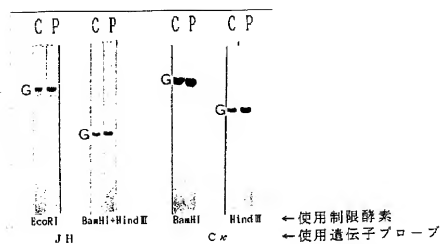


図3 抽出DNAを用いたジェノミックスザンハイブリダイゼーション)
 C: コントロール
 P: 検体
 G: Germline